


AU

Derivatives of porphyrin and metalloporphyrins optionally coupled to a biologically active molecule and pharmaceutical composition containing them

Patent Number: ☐ US5268371
 Publication date: 1993-12-07
 Inventor(s): MAUCLAIRE LAURENT (FR); SACCAVINI JEAN-CLAUDE (FR); BEDEL CATHERINE (FR); PEREYRE MICHEL (FR)
 Applicant(s): CIS BIO INT (FR)
 Requested Patent: ☐ FR2656866
 Application Number: US19920943299 19920910
 Priority Number(s): FR19900000214 19900110
 IPC Classification: A61K31/40 ; C07D487/22
 EC Classification: A61K47/48T2C, A61K49/00B, A61K51/04F, C07D487/22
 Equivalents: ☐ EP0510074 (WO9110667), ☐ WO9110667

Abstract

The present invention relates to metallized porphyrin derivatives having the formula:  (III) wherein the R and M variables are as defined in the specification. Said porphyrin derivatives having uses as antitumor agents, diagnostics agents, or in therapy.

Data supplied from the esp@cenet database - 12

①2

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 10.01.90.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : 12.07.91 Bulletin 91/28.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche : *Se reporter à la fin du présent fascicule.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : CIS bio international et COMPAGNIE
ORIS INDUSTRIE (S.A.) — FR.

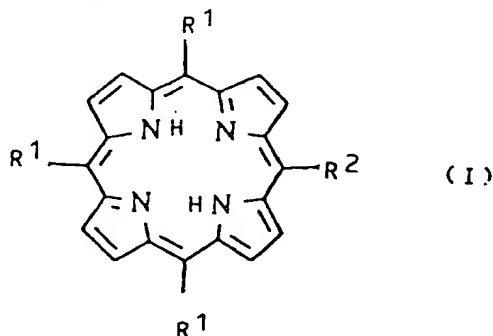
⑦2 Inventeur(s) : Mauclair Laurent, Bedel Catherine,
Pereyre Michel et Saccavini Jean Claude.

⑦3 Titulaire(s) : CIS bio international.

⑦4 Mandataire : Brevatome.

⑤4 Dérivés de porphyrine et métalloporphyrines éventuellement couplés à une molécule biologiquement active ,
et composition pharmaceutique les contenant.

⑤7 L'invention concerne des dérivés de porphyrine répon-
dant à la formule:



dans laquelle les R¹ représentent un radical pyridyle, et R²
représente un radical phényle substitué; et les sels de pyri-
dylum de ces dérivés de formule (I).

Ces dérivés peuvent être métallés et couplés à une mo-
lécule biologiquement active telle qu'un anticorps, ce qui
les rend intéressants pour des applications en diagnostic
ou en thérapie.



Dérivés de porphyrine et métalloporphyrines éventuellement couplés à une molécule biologiquement active, et composition pharmaceutique les contenant.

5 La présente invention a pour objet un dérivé de porphyrine éventuellement métallé, qui peut être couplé à une molécule biologiquement active.

 De façon plus précise, elle concerne des dérivés de porphyrine utilisables dans le domaine
10 pharmaceutique, soit comme agents antitumoraux, soit comme agents de diagnostic ou de thérapie, notamment lorsqu'ils comprennent un métal radioactif.

 L'utilisation de composés marqués par un élément radioactif, comme agent de diagnostic
15 ou de thérapie, est devenue d'une pratique courante dans les laboratoires d'analyses et les milieux hospitaliers où ces composés marqués sont employés soit pour réaliser des scintigraphies, soit pour irradier ponctuellement un centre malin.

20 Pour ces utilisations, il est nécessaire d'obtenir une liaison stable entre l'élément radioactif et le composé, ce qui est difficile à obtenir avec la plupart des éléments radioactifs. Aussi, on a surtout utilisé jusqu'à présent l'iode radioactif, qui est capable de se fixer directement à de
25 nombreux principes actifs. On a utilisé également dans ce but, le carbone-11, le tritium et le phosphore-32. Cependant, l'instabilité "in vivo" de certains de ces éléments radioactifs a entraîné une nouvelle
30 approche pour réaliser les composés marqués.

 Ainsi, afin de pouvoir utiliser des métaux et autres éléments, on a réalisé certains marquages par chélation des traceurs métalliques radioactifs ; le complexe ainsi formé peut être fixé aux éléments

protéiques ou à leurs dérivés par une liaison covalente. Les agents de chélation les plus couramment utilisés sont l'acide éthylène diamine tétracétique (EDTA) et ses dérivés ainsi que l'acide diéthylène triamine pentacétique (DTPA).

Bien que ces agents complexants aient permis d'obtenir de meilleurs résultats, notamment pour le marquage d'anticorps monoclonaux, il n'en demeure pas moins que les produits marqués obtenus présentent également une instabilité "in vivo". En effet, certaines protéines plasmatiques telles que la transférine, l'albumine etc. déplacent les métaux du complexe EDTA et DTPA ; de ce fait, les métaux radioactifs se retrouvent dans le sang circulant et perturbent l'analyse scintigraphique.

Aussi, on a envisagé l'utilisation d'autres chélatants.

Les porphyrines sont des composés de structure cyclique tétrapyrrolique, très largement répandus chez tous les êtres vivants, qui existent entre autres sous forme de complexes métalloporphyriniques et peuvent de ce fait comporter de nombreux métaux. Certaines de ces porphyrines possèdent une activité physiologique, en particulier un tropisme tumoral, ainsi que des propriétés photosensibilisatrices qui peuvent être utilisées pour le diagnostic ou pour la thérapie, comme il est décrit dans le document EP-A- 0 210 351.

Les porphyrines utilisées dans EP-A- 0 210 351 sont des dérivés substitués de la porphine qui comportent au moins trois groupes acides carboxyliques. Ces porphyrines ont une affinité pour les cellules tumorales et lorsqu'elles sont soumises à un rayonnement approprié, elles émettent de la

lumière, ce qui permet de détecter la présence, la position et la taille d'une tumeur. Ensuite, lorsque l'on irradie la tumeur avec une lumière d'une longueur d'ondes et d'une intensité appropriées, la porphyrine est activée et exerce un effet de destruction sur les cellules tumorales.

Toutefois, le tropisme tumoral de ces porphyrines n'est pas exclusif et une concentration non négligeable de celles-ci se trouve dans tous les tissus, en particulier dans le foie comme il est indiqué dans EP-A- 0 322 198. De ce fait, dans le cas d'une utilisation pour la destruction des cellules tumorales, l'irradiation conduit également à une destruction des tissus sains. De plus, certains composés porphyriniques ont un effet toxique notable, à forte concentration, sur la motricité nerveuse comme il a été décrit par A.A.F. Sima et Col. dans Can. J. Neurol. Sci., 8, 105-114 (1981).

Pour obtenir une affinité exclusive des porphyrines pour les cellules tumorales, on a envisagé de coupler les porphyrines à des anticorps spécifiques de ces cellules tumorales, comme il est décrit par J.C. Roberts et col. dans J. Immunol. Methods, 105, 153 (1987) et dans le document US-A- 4 783 529.

Selon ces documents, on obtient ce couplage en faisant réagir la porphyrine non métallée avec un composé benzyl diphénylsulfonium, en la conjuguant ensuite avec un anticorps et en réalisant en dernier lieu la métallation par l'élément radioactif. Cependant, ce mode de préparation ne peut être utilisé avec toutes les porphyrines car il est limité surtout à celles possédant des groupements carboxyliques. De plus, le couplage doit être réalisé en présence d'un cosolvant organique en raison de la faible

hydrosolubilité du dérivé de porphyrine, et la métallation ultérieure ne peut être envisagée qu'avec des métaux de petite taille tels que le cuivre, le zinc, le nickel, car la température indispensable pour insérer des métaux lourds tels que l'indium, l'yttrium, le rhénium ou le technétium en des temps raisonnables entraînerait une dégradation de l'anti-

Aussi, il serait d'un grand intérêt de disposer de dérivés de porphyrine pouvant être métallés par n'importe quel métal et présentant une meilleure hydrosolubilité afin de pouvoir réaliser leur couplage avec des molécules biologiquement actives en solution aqueuse.

On sait que certaines porphyrines substituées peuvent être solubles dans l'eau comme il est décrit dans EP-A- 0 322 198, et EP-A- 0 186 982.

Dans EP-A- 0 322 198, l'hydrosolubilité est obtenue en convertissant une phéophorbide en son chlorhydrate d'éthylène diamine.

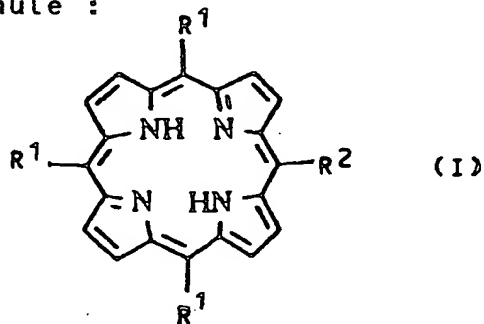
Dans EP-A- 0 186 982, l'hydrosolubilité est obtenue par la présence de substituants constitués par des groupes sulfonate, hydroxy-amino ou sulfhydryle.

Cependant, dans ces deux documents, les porphyrines ne conviennent pas pour un couplage avec des molécules biologiquement actives et un élément radioactif.

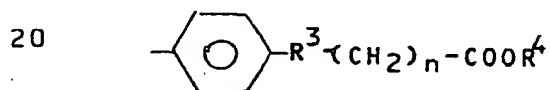
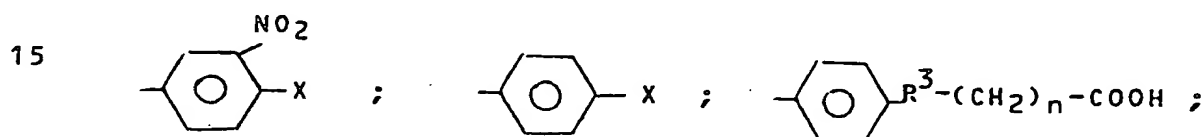
La présente invention a précisément pour objet de nouveaux dérivés de porphyrines hydrosolubles sur lesquels on peut fixer de très nombreux métaux radioactifs et qui peuvent être couplés facilement à une molécule biologiquement active telle qu'un

anticorps.

Selon, l'invention, le dérivé de porphyrine répond à la formule :



dans laquelle les R^1 représentent un radical pyridyle, et R^2 représente un radical choisi parmi les radicaux répondant aux formules :



dans lesquelles X représente F, Cl ou Br, R^3 est une simple liaison, S ou O, n est un nombre entier de 1 à 7 et R^4 est un radical alkyle en C₁ à C₄, un radical benzyle ou le radical de formule :

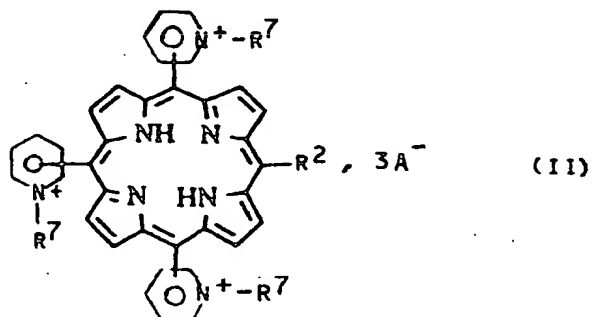


dans laquelle R^5 est choisi parmi F, Cl, Br, I, NO₂ et le radical de formule SR^6 dans laquelle R^6 est un radical alkyle en C₁ à C₄, p est égal à 1

lorsque R^5 représente NO_2 ou SR^6 , p est égal à 4 ou 5 lorsque R^5 représente F, Cl, Br ou I, et R^5 est en position ortho ou para lorsque p est égal à 1.

De préférence, R^4 et R^6 sont des radicaux méthyle ou éthyle.

L'invention concerne également les sels de pyridylum du dérivé de formule (I). Ces sels de pyridylum peuvent répondre à la formule :

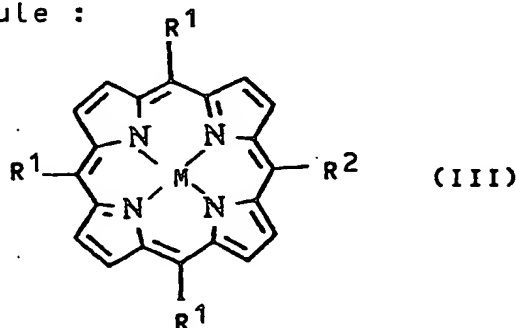


dans laquelle R^2 a la signification donnée ci-dessus, R^7 est un radical alkyle en C_1 à C_4 et A^- est un anion choisi parmi Cl^- , Br^- et I^- .

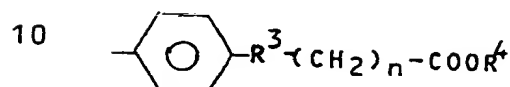
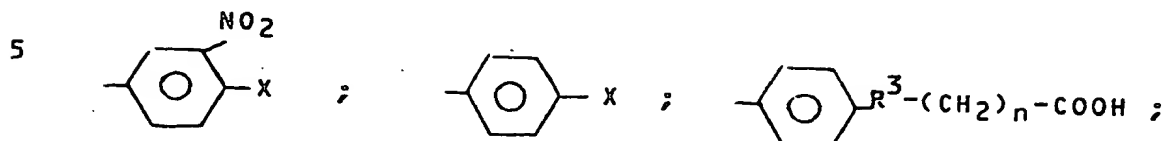
De préférence, A^- est Cl^- et R^7 est le radical méthyle ou éthyle.

Dans les dérivés de porphyrine de l'invention, le radical pyridyle R^1 peut être rattaché au noyau porphine par l'atome de carbone en position 2, 3 ou 4 par rapport à N du noyau pyridyle.

Les dérivés de porphyrine de l'invention peuvent être métallés facilement. Aussi, l'invention a également pour objet le dérivé de porphyrine répondant à la formule :



dans laquelle les R^1 représentent un radical pyridyle,
et R^2 représente un radical choisi parmi les radicaux
répondant aux formules :

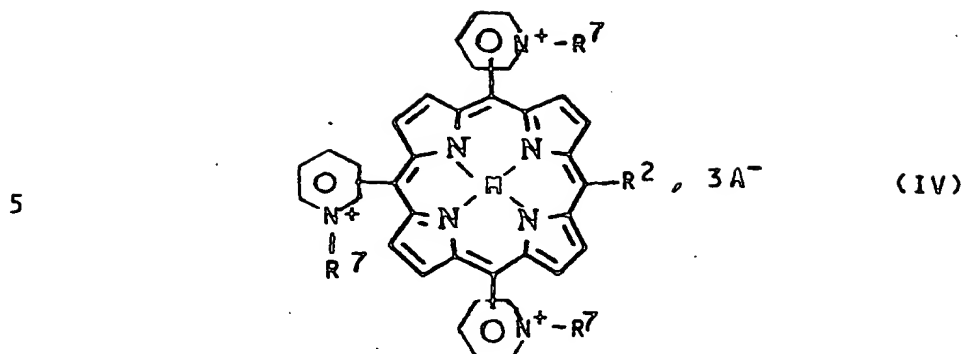


dans lesquelles X représente F, Cl ou Br, R^3 est
une simple liaison, S ou O, n est un nombre entier
15 de 1 à 7 et R^4 est un radical alkyle en C_1 à C_4 ,
un radical benzyle ou le radical de formule :



dans laquelle R^5 est choisi parmi F, Cl, Br, I,
 NO_2 et le radical de formule SR^6 dans laquelle R^6
est un radical alkyle en C_1 à C_4 , p est égal à 1
25 lorsque R^5 représente NO_2 ou SR^6 , p est égal à 4
ou 5 lorsque R^5 représente F, Cl, Br ou I, R^5
est en position ortho ou para lorsque p est égal
à 1, et M est un métal ; et les sels de pyridylum
de ce dérivé de formule (III).

30 Lorsque ce dérivé est sous la forme de
sel de pyridylum, il répond par exemple à la formu-
le :



10 dans laquelle R^2 a la signification donnée ci-dessus, R^7 est un radical alkyle en C_1 à C_4 , A est un anion choisi parmi Cl^- , Br^- et I^- , et M est un métal.

15 Dans ce cas, comme précédemment, A^- représente de préférence Cl^- et R^7 est le radical méthyle ou éthyle.

Dans ces dérivés métallés, le métal M est de préférence radioactif, et il peut être aussi bien un métal de petite taille comme Cu, Zn et Ni, qu'un métal lourd, par exemple In, Gd, Y, Re, Tc, 20 Sn, Ga, dont les isotopes radioactifs possèdent des propriétés avantageuses pour la thérapie ou le diagnostic.

25 Le métal radioactif peut être en particulier l'indium-111, le technétium-99m, le rhénium-186 ou le rhénium-188.

Les dérivés de porphyrine de l'invention sont donc très intéressants pour une utilisation en médecine.

30 En effet, la présence du substituant R^2 leur confère la propriété de pouvoir être liés de façon covalente à des molécules biologiquement actives telles que des anticorps.

35 Ceci provient de la présence d'un halogène, d'un groupe $COOH$ ou d'un groupe ester activé sur le substituant R^2 , qui permet de faire réagir la porphyrine avec les fonctions amine, carboxylique, alcool ou thiol des résidus d'acides aminés et les

résidus osidiques des protéines. L'halogène peut réagir avec les fonctions amine de la chaîne latérale des lysines et du noyau imidazole des histidines, ainsi qu'avec les fonctions alcool et thiol des sérines, tyrosines et cystéines. Les groupes COOH et les groupes COOR⁴ peuvent réagir avec les fonctions amine des lysines, les fonctions thiol des cystéines et les hydroxyle des sérines et surtout des tyrosines.

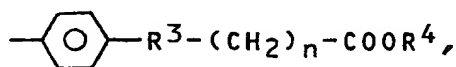
Par ailleurs, on peut obtenir avec les dérivés de l'invention les propriétés voulues de solubilité dans l'eau en quaternisant les groupes pyridyle pour former les sels de pyridylum correspondants.

Ainsi, les dérivés de porphyrines de l'invention sont solubles dans l'eau, peuvent être métallés par un élément radioactif et possèdent de plus un substituant capable de réagir avec une molécule biologiquement active telle qu'un anticorps.

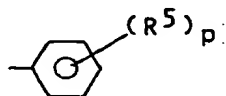
Selon l'invention, R² peut représenter les différents groupements décrits ci-dessus.

Toutefois, lorsque le dérivé de l'invention doit être couplé à une molécule biologiquement active, R² ne peut représenter un radical comportant un groupe ester si ce groupe ester n'est pas activé.

Aussi, pour cette utilisation lorsque R² représente le radical de formule :

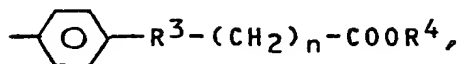
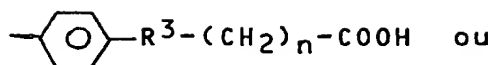


R⁴ représente



avec R⁵ et p ayant la signification donnée ci-dessus.

Lorsque R² représente



5 R^3 peut représenter O, S ou une simple liaison.

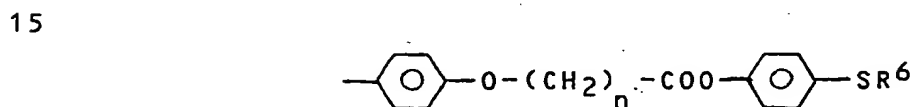
A titre d'exemple de tels R^2 , on peut citer :

- le radical de formule



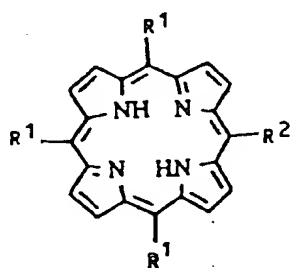
dans laquelle n est un nombre entier de 1 à 7, et

- le radical de formule :

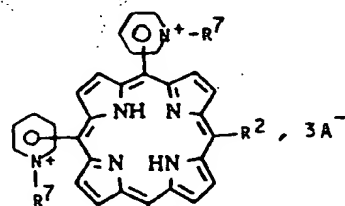


dans laquelle n est un nombre entier de 1 à 7 et R^6 est le radical méthyle ou éthyle.

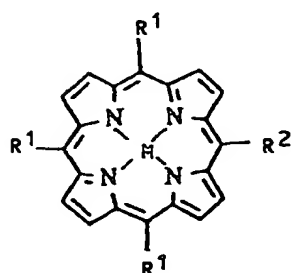
20 L'invention a encore pour objet un composé conjugué d'une molécule biologiquement active et d'un dérivé de porphyrine répondant aux formules :



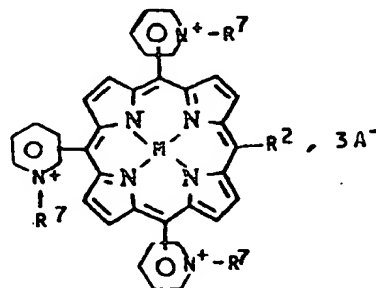
(I)



(II)



(III)

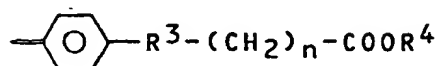


(IV)

35

dans lesquelles R^1 , R^2 , R^7 , A et M ont les significations données ci-dessus à condition que R^2 ne représente pas le radical de formule :

5

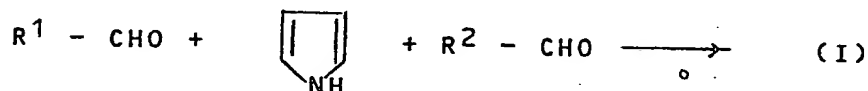


avec R^4 représentant un radical alkyle ou benzyle.

10

Les dérivés de porphyrines de l'invention non métallés peuvent être préparés par un procédé classique à partir du pyrrole, de formylpyridine et du benzaldéhyde substitué correspondant de formule $R^2\text{CHO}$. Cette réaction correspond au schéma réactionnel suivant :

15



20

Cette synthèse conduit à un mélange de 6 porphyrines que l'on sépare par exemple par chromatographie pour isoler uniquement le dérivé tripyridylique de formule (I) de l'invention.

25

Selon l'invention, le choix du dérivé tripyridylique de formule (I) permet d'éviter toute réticulation ultérieure lors du couplage de ce dérivé avec une molécule biologiquement active et surtout d'hydrosolubiliser ce dérivé en formant le sel de pyridylum correspondant par quaternisation des positions pyridyliques, par exemple par méthylation.

30

Les dérivés de porphyrine sous la forme de sel de pyridylum répondant à la formule (II)

35

peuvent être préparés facilement à partir du dérivé de formule (I) par une simple réaction d'alkylation au moyen d'un halogénure d'alkyle, par exemple l'iodure de méthyle. On peut ensuite transformer l'iodure de pyridylum en chlorure par passage sur une résine anionique échangeuse d'ions chlorure.

Les dérivés de porphyrines métallés de l'invention peuvent être préparés en portant au reflux le dérivé de porphyrine de formule (I) ou de formule (II) avec une solution d'un sel du métal M à inclure.

Lorsque le métal à inclure est de l'indium, par exemple de l'indium radioactif, on met en contact une solution de la porphyrine, de préférence sous forme de sel de pyridylum, dans un mélange d'acide acétique et trifluoroacétique auquel on ajoute du trichlorure d'indium.

Le fait d'inclure l'élément métallique avant couplage du dérivé de porphyrine avec une molécule biologiquement active, permet d'inclure n'importe quel métal, par exemple du cuivre, de l'indium, de l'étain, du gallium, du gadolinium, de l'yttrium, du rhénium, du technétium. Après cette métallation, on peut coupler le dérivé de porphyrine avec une molécule biologiquement active, par exemple un anticorps.

De préférence, pour cette réaction de couplage, on utilise le dérivé de porphyrine sous la forme de sel de pyridylum pour opérer en solution aqueuse. On peut réaliser le couplage, soit par voie directe dans le cas des dérivés de porphyrine avec R^2 comportant un atome d'halogène ou une fonction ester activé, soit par l'intermédiaire d'un carbodiimide et de N-hydroxysuccinimide dans le cas des

dérivés de porphyrine avec R^2 comportant un groupe carboxylique. La méthode utilisée peut être celle décrite par Lavalley et col. dans US-A- 4 783 529.

5 Les molécules biologiquement actives susceptibles d'être couplées au dérivé de porphyrine de l'invention peuvent être de différents types. A titre d'exemple de telles molécules, on peut citer les antigènes, les anticorps, les haptènes, en particulier les anticorps et notamment les anticorps
10 monoclonaux.

Les dérivés de porphyrine de l'invention peuvent trouver de nombreuses applications dans le domaine médical pour le diagnostic ou pour la
15 thérapie.

Ainsi, les dérivés de porphyrine métallés par un élément radioactif ainsi que les dérivés non métallés peuvent être utilisés par exemple comme agents de diagnostic ou de thérapie des tumeurs.

20 Aussi, l'invention a également pour objet des compositions pharmaceutiques comprenant de tels dérivés, de préférence dans une solution aqueuse.

Ces compositions peuvent être administrées par injection, par exemple par voie intraveineuse. Après cette injection, le dérivé de porphyrine se
25 localise dans la tumeur, ce qui permet de détecter ou traiter la tumeur.

Lorsque le dérivé n'est pas métallé, on peut détecter la tumeur par irradiation à une longueur d'onde telle que l'on obtienne une émission
30 de lumière fluorescente à partir de ce dérivé.

Lorsque le dérivé est métallé par un élément radioactif, on peut détecter la tumeur par scintigraphie.

35 Pour la thérapie, lorsque le dérivé injecté

n'est pas métallé, on effectue ensuite une irradiation de la tumeur par une lumière ayant une longueur d'onde appropriée pour activer le dérivé de porphyrine et nécroser les cellules tumorales.

5 Les doses de dérivé utilisées dépendent en particulier de l'importance de la tumeur, et peuvent se situer dans la gamme allant de 0,01 à 20mg/kg/jour.

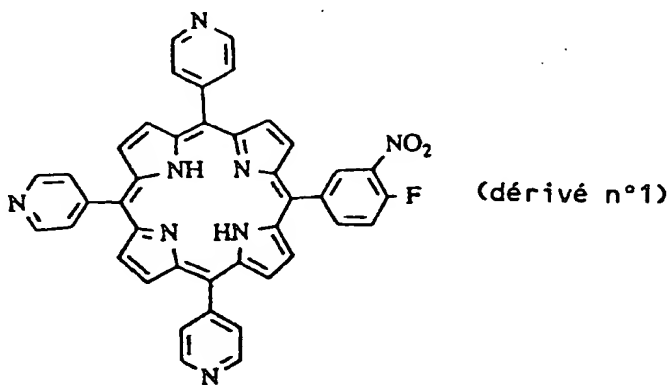
10 Les dérivés de porphyrine non métallés ou métallés par un métal radioactif, et couplés à une molécule biologiquement active peuvent être utilisés dans le même but et sont plus intéressants car ils présentent une affinité améliorée due à la présence de cette molécule biologiquement active,
15 par exemple d'un anticorps spécifique des cellules tumorales à détecter ou à détruire.

D'autres caractéristiques de l'invention apparaîtront mieux à la lecture des exemples suivants donnés bien entendu à titre illustratif et non limita-
20 tif.

Exemple 1 : Préparation de la (3-nitro 4-fluoro phényl)tripyrindyl porphyrine.

Ce dérivé répond à la formule :

25



30

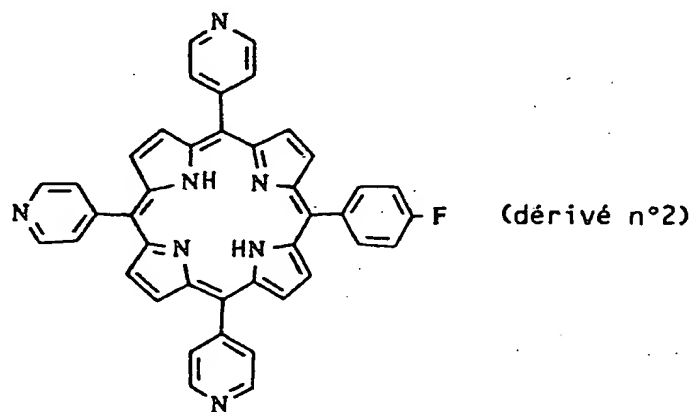
35 Dans un ballon contenant 200ml d'acide propionique maintenu sous agitation magnétique,

on mélange 8.10^{-2} mol de pyrrole, $1,33.10^{-2}$ mol de 3-nitro 4-fluoro benzaldéhyde et $6,66.10^{-2}$ mol de 4-formyl pyridine. Après une heure à la température de reflux de l'acide, on laisse la solution revenir à la température ambiante. On évapore l'acide propionique sous pression réduite et on précipite le mélange de porphyrines dans le minimum de diméthylformamide (DMF).

On sépare ensuite les 6 macrocycles sur une colonne de gel de silice. Le dérivé, n°1 attendu est obtenu par une élution chloroforme/méthanol (97:3) avec un rendement de 1,9%.

Exemple 2 : Préparation de la (4-fluorophényl)tripyrindyl porphyrine.

Ce dérivé répond à la formule :



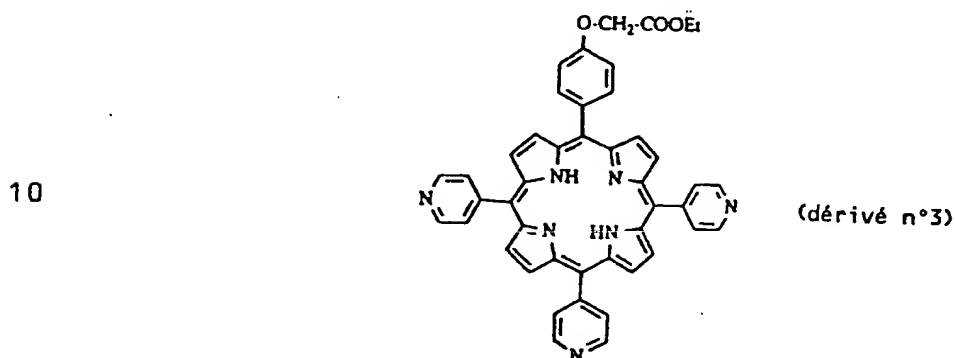
On suit le même mode opératoire que dans l'exemple 1 pour préparer cette porphyrine, sauf que l'on utilise $1,33.10^{-2}$ mol de 4-fluorobenzaldéhyde au lieu de $1,33.10^{-2}$ mol de 3-nitro 4-fluoro benzaldéhyde.

On précipite le mélange de porphyrines après redissolution dans le minimum de DMF par addition de méthanol. On sépare les 6 macrocycles sur une colonne de gel de silice, le dérivé n°2 est

obtenu par une élution chloroforme / méthanol (97:3) avec un rendement de 2,6%.

Exemple 3 : Préparation de l'ester éthylique de la (4-(carboxyméthoxy)phényl)tripyrindyl porphyrine.

5 Ce dérivé répond à la formule :



15 Dans un ballon, on ajoute 200ml d'acide propionique, $8 \cdot 10^{-2}$ mol de pyrrole, $1,33 \cdot 10^{-2}$ mol de l'ester éthylique du 4-(carboxyméthoxy)benzaldéhyde et $6,66 \cdot 10^{-2}$ mol de 4-formyl pyridine. Après une heure de reflux, on laisse revenir le milieu réactionnel à la température ambiante. On élimine l'acide propionique par évaporation sous pression réduite et on précipite les 6 porphyrines mixtes par addition de méthanol après redissolution du résidu dans le DMF chaud.

20

25 On sépare ensuite les 6 macrocycles par chromatographie liquide sous haute pression préparative en utilisant une colonne de silice d'une longueur de 200mm et d'un diamètre de 40mm contenant de la silice ayant une dimension moyenne de particules de $20 \mu\text{m}$ et un rayon moyen de pores de 60Å . On utilise comme éluant un mélange de chloroforme et de méthanol dont le pourcentage en méthanol varie de 0 à 3%, à un débit de 1,2ml/min. On obtient ainsi le dérivé de porphyrine n°3 avec un rendement de 5,6%.

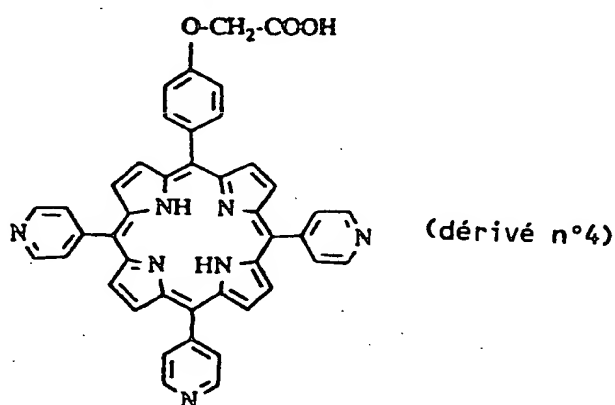
30

35

L'ester éthylique du 4-(carboxyméthoxy)benzaldéhyde utilisé comme produit de départ dans cet exemple a été préparé à partir de l'acide 4-formylphénoxy acétique par estérification en présence de N,N'-carbonyl diimidazole.

Exemple 4 : Préparation de la (4-(carboxyméthoxy)phényl)tripyridyl porphyrine.

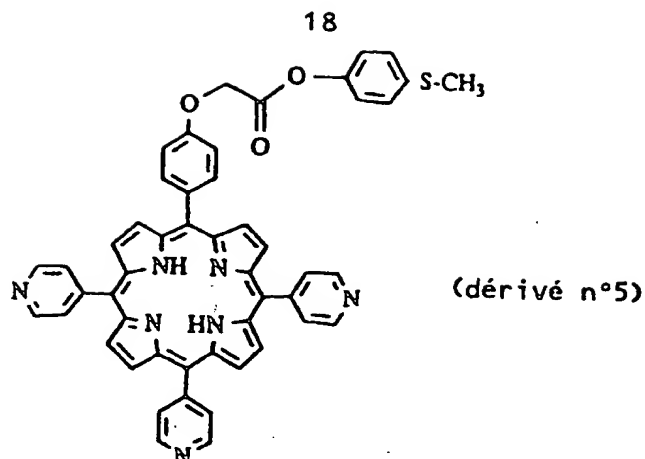
Ce dérivé répond à la formule :



On dissout $7,22 \cdot 10^{-5}$ mol de l'ester éthylique obtenu dans l'exemple 3 dans 50ml de tétrahydrofuranne (THF). On ajoute 1ml d'une solution d'hydroxyde de sodium - éthanol (4g de NaOH dissous dans 5ml d'eau auxquels on ajoute 50ml d'éthanol). On porte le milieu réactionnel au reflux pendant une heure. On évapore le solvant et on reprend le résidu solide par du chloroforme, puis on le lave au moyen d'une solution d'acide chlorhydrique 0,1M. On filtre l'ensemble et on redissout le résidu solide dans du méthanol. On filtre la solution alcoolique, puis on l'évapore pour récupérer le dérivé de porphyrine attendu n°4 avec un rendement de 95%.

Exemple 5 : Préparation de l'ester 4-méthyl mercaptophénylique de la (4-(carboxyméthoxy)phényl) tripyridyl porphyrine.

Ce dérivé répond à la formule :



10

On dissout $2,5 \cdot 10^{-5}$ mol de la (4-(carboxyméthoxy)phényl)tripyridyl porphyrine obtenue dans l'exemple 4 dans 30ml de THF et 5ml de DMF avec $2,5 \cdot 10^{-4}$ mol de dicyclocarbodiimide (DCC). Lorsque la solution est homogène, on ajoute à 0°C , $5 \cdot 10^{-4}$ mol de 4-méthylmercapto phénol. Après cette addition, on laisse revenir le milieu réactionnel à la température ambiante et on le maintient sous agitation magnétique pendant 24 heures. On évapore le solvant, et on chromatographie sur gel de silice le milieu réactionnel en utilisant comme éluant un mélange chloroforme - méthanol (97:3). On obtient ainsi le dérivé n°5 avec un rendement de 78%.

Ses caractéristiques physicochimiques sont les suivantes :

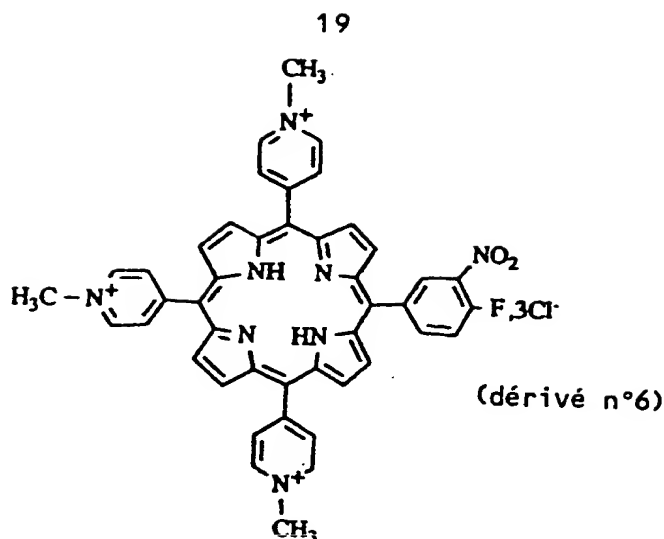
Spectrométrie U.V. visible (CHCl_3) $\lambda(\text{nm})$: 417 ; 513 ; 548 ; 588 ; 644,5.

^1H RMN (CDCl_3) δ (ppm) : 8,94 (2H, d) ; 8,81 (2H, d) ; 8,85 (4H, s) ; 9,06 (6H, m) ; 8,17 (6H, m) ; 8,12 (2H, m) ; 7,33 (2H, m) ; - 2,88 NH.

Exemple 6 : Préparation du chlorure de (3-nitro 4-fluoro phényl)triméthylpyridylum porphyrine.

Ce dérivé répond à la formule :

35



On dissout $1,3 \cdot 10^{-4}$ mol de la (3-nitro 4-fluorophényl)tripyridyl porphyrine obtenue dans l'exemple 1 dans 10ml de DMF et 20ml de iodométhane.

On maintient la solution à 40°C pendant 2 heures sous agitation magnétique. Après ce temps, on laisse revenir à la température ambiante, puis on ajoute 150ml d'éther éthylique pour précipiter la porphyrine. On récupère celle-ci par filtration, on la sèche, puis on la redissout dans du méthanol et on la chromatographie sur une résine anionique échangeuse d'ions chlorure. On récupère ainsi le chlorure en solution dans le méthanol, on l'évapore à sec et on le sèche sous vide.

On obtient ainsi le chlorure, soit le dérivé n°6, avec un rendement de 88%.

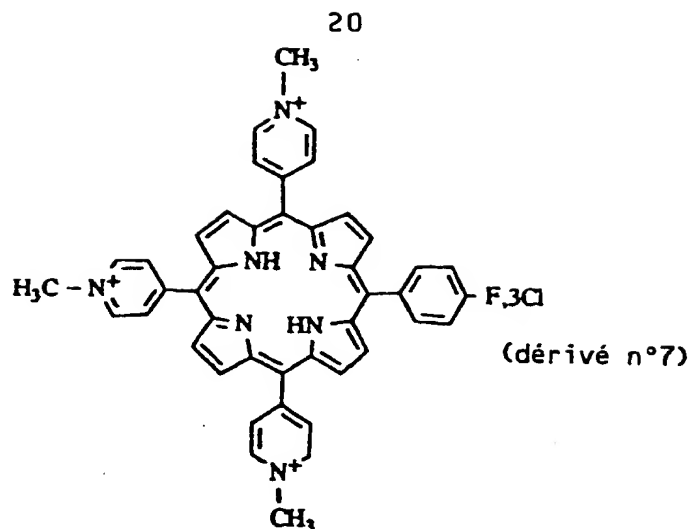
Ses caractéristiques physicochimiques sont les suivantes :

Spectrométrie UV visible (méthanol) λ (en nm) : 418 ; 512,5 ; 549,5 ; 589 ; 646,5.

^1H RMN (CD_3OD) (δ ppm) : 9,05 (8H, m, L) ; 9,39 (6H, m) ; 8,93 (6H, m) ; 9,2 à 8,95 (2H, m) 8,71 (1H, m) ; - 2,92 (NH).

Exemple 7 : Préparation du chlorure de (4-fluorophényl)triméthylpyridylium porphyrine.

Ce dérivé répond à la formule :



On suit le même mode opératoire que dans l'exemple 6 sauf que l'on part de $1,3 \cdot 10^{-4}$ mol de la (4-fluorophényl)tripyrindyl porphyrine obtenue dans l'exemple 2.

On obtient ainsi le chlorure (dérivé n°7) avec un rendement de 87%.

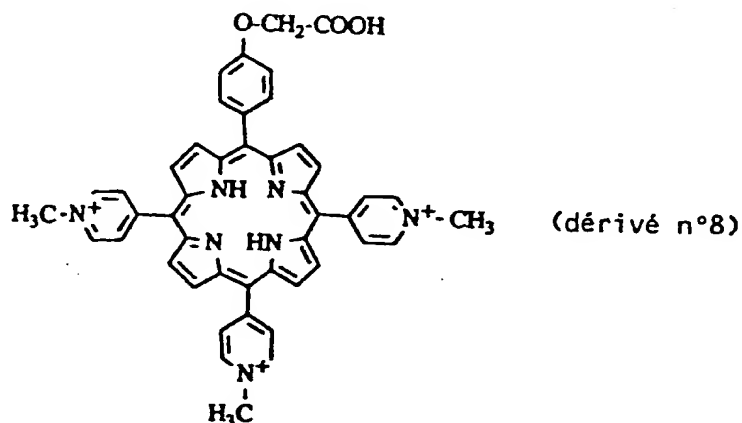
Ses caractéristiques physico-chimiques sont les suivantes :

Spectrométrie UV visible (méthanol), λ (en nm) ; 422 ; 514,5 ; 551 ; 589,5 ; 646,5 .

^1H RMN (CD_3OD) δ (ppm) : 9,11 (8H, m L) ; 9,39 (6H, d) 8,97 (6H, d) ; 8,18 (2H, m) ; 7,54 (2H, m) ; - 2,90 (NH).

Exemple 8 : Préparation du chlorure de (4-(carboxyméthoxy) phényl)triméthylpyridylium porphyrine.

Ce dérivé répond à la formule :



On suit le même mode opératoire que dans l'exemple 6 pour préparer ce chlorure, sauf que l'on part de $1,3 \cdot 10^{-4}$ mol de la (4-(carboxyméthoxy)phényl)tripyridyl porphyrine obtenue dans l'exemple 4.

On obtient ainsi le chlorure (dérivé n°8) avec un rendement de 70%.

Ses caractéristiques physico-chimiques sont les suivantes :

Spectrométrie UV visible (MeOH) λ (nm) : 427,5 ; 518,5 ; 556 ; 592 ; 627,5.

^1H RMN (CD_3OD) δ (ppm) : 9,05 (8H, m, L) ; 9,37 (6H, d) ; 8,93 (6H, d) ; 8,09 (2H, m) ; 7,37 (2H, m) ; - 2,96 (NH).

Exemple 9 : Préparation du chlorure de la ((3-nitro 4-fluoro)phényl) triméthyl pyridylum porphyrine d'indium (dérivé n°9).

Dans cet exemple, on insère de l'indium dans la porphyrine fluorée quaternisée obtenue dans l'exemple 6 en utilisant un mélange isotopique d'indium.

On évapore à sec sous courant d'azote une mCi de trichlorure d'indium en solution chlorhydrique. Après évaporation, on ajoute $1,05 \cdot 10^{-7}$ mol de trichlorure d'indium 115 et $1,40 \cdot 10^{-7}$ mol de la porphyrine quaternisée (dérivé n°6) de l'exemple 6 en solution dans un mélange d'acide acétique et trifluoroacétique (96,7 et 3,3%). On porte la solution au reflux pendant 3 heures sous agitation magnétique.

On ajuste le pH de la solution à 4-5 par addition de soude 1M. On chromatographie le produit sur une résine anionique et on le récupère par fraction de 1ml. On obtient ainsi le chlorure de la ((3-nitro 4-fluoro)phényl) triméthylpyridylum porphyrine de l'indium avec un rendement de 75%.

Exemple 10 : Préparation du chlorure de la (4-fluorophényl)triméthyl pyridylum porphyrine de l'indium(dérivé n° 10).

On suit le même mode opératoire que dans l'exemple 9, sauf que l'on part de la porphyrine obtenue dans l'exemple 7 (dérivé n°7).

On obtient dans ces conditions le chlorure de la (4-fluorophényl)triméthylpyridylum porphyrine de l'indium avec un rendement de 85%.

10 Exemple 11 : Préparation du chlorure de la (4-(carboxyméthoxy)phényl) triméthyl pyridylum porphyrine de l'indium (dérivé n° 11).

On suit le même mode opératoire que dans l'exemple 9, sauf que l'on part de la porphyrine de l'exemple 8 (dérivé n°8).

On obtient ainsi le chlorure de la (4(carboxyméthoxy)phényl) triméthyl pyridylum porphyrine de l'indium avec un rendement de 87%.

20 Exemple 12 : Préparation de l'ester 4-méthylmercapto-phénylique de la (4-(carboxyméthoxy)phényl)tripyridyl porphyrine de l'indium (dérivé n° 12).

Dans cet exemple on utilise également un mélange isotopique d'indium.

On évapore à sec sous courant d'azote 1mCi de trichlorure d'indium 111 en solution chlorhydrique. Lorsque l'évaporation est terminée on ajoute $1,05 \cdot 10^{-7}$ mol de trichlorure d'indium 115 et $1,40 \cdot 10^{-7}$ mol de la porphyrine de l'exemple 5 en solution dans un mélange d'acides acétique et trifluoroacétique (96,7 et 3,3%). On porte la solution au reflux pendant 3h sous agitation magnétique. Lorsque la réaction est terminée, on ramène le pH à 4-5 par addition de soude 1M. On extrait ensuite la métalloporphyrine par extraction chloroformique (2 fois 10ml), on

recupère la phase organique et on l'évapore.

On obtient ainsi l'ester 4-méthylmercaptophénylique de la (4(carboxyméthoxy)phényl)tripyridine porphyrine de l'indium avec un rendement de 53%.

5 Ce rendement qui est plus faible que dans le cas des porphyrines précédentes confirme l'instabilité de l'ester en milieu acide.

Exemple 13 : Préparation du chlorure de l'ester
4-méthylmercaptophénylique de la (4-(carboxyméthoxy)-
10 phényl)triméthylpyridylium porphyrine de l'indium.

On dissout dans 5ml d'iodure de méthyle, 7.10^{-8} mol de la porphyrine d'indium obtenue dans l'exemple 12 et on porte le milieu réactionnel à 40°C pendant 2h sous agitation magnétique. On évapore
15 ensuite l'iodure de méthyle en excès, on reprend la porphyrine quaternisée par 2ml de méthanol et on la chromatographie sur une résine anionique échangeuse d'ions chlorure et on l'évapore à sec. On obtient ainsi la porphyrine quaternisée de l'indium
20 avec un rendement de 74%.

Exemple 14 : Préparation d'un composé conjugué de
chlorure de (3-nitro 4-fluorophényl)triméthylpyridy-
lium porphyrine de l'indium et de sérum albumine
bovine (BSA).

25 Dans cet exemple, on utilise la porphyrine quaternisée et métallée obtenue dans l'exemple 9 et on la couple avec une molécule biologiquement active constituée par BSA.

On dissout $6,9.10^{-8}$ mol de la porphyrine métallée de l'exemple 9 dans 200ul d'eau et on ajoute
30 1ml de BSA à 30% dans l'eau. On laisse l'ensemble à la température ambiante et sous agitation pendant 1h30, puis on chromatographie sur une colonne de 10ml de gel Sephadex® G75. On récupère le composé

conjugué par fractions de 1ml entre la 3è et la 8è fraction. Le rendement est de 95%.

5 Exemple 15 : Préparation du composé conjugué du chlorure de (4-fluorophényl)triméthylpyridylum porphyrine de l'indium 111 et de BSA.

On suit le même mode opératoire que dans l'exemple 14, sauf que l'on part de la porphyrine métallée obtenue dans l'exemple 10.

10 On obtient ainsi le composé conjugué avec un rendement de 97%.

Exemple 16 : Préparation du composé conjugué du chlorure de l'ester 4-méthylmercaptophénylique de la ((4-méthoxycarboxy)phényl)triméthyl pyridylum de l'indium 111 et de BSA.

15 On suit le même mode opératoire que dans l'exemple 14, sauf que l'on utilise la porphyrine de l'exemple 13. On obtient ainsi le composé conjugué avec un rendement de 67%.

20 Exemple 17 : Préparation du composé conjugué du chlorure de la ((4-méthoxycarboxy)phényl) triméthylpyridylum porphyrine de l'indium 111 et de BSA.

On dissout $6,90 \cdot 10^{-8}$ mol de la porphyrine d'indium obtenue dans l'exemple 11 dans 200µl d'eau et on y ajoute 1ml de BSA à 30% dans l'eau.
25 On ajoute ensuite $1,30 \cdot 10^{-5}$ mol de N-hydroxysuccinimide et $1,30 \cdot 10^{-5}$ mol d'éthyldiméthylaminocarbodiimide. On laisse le milieu réactionnel pendant 1h30, puis on chromatographie sur colonne de gel Sephadex 675 et on récupère le composé conjugué par fractions
30 de 1ml entre la 3è et la 8è fraction. On obtient ainsi ce composé avec un rendement de 38%.

Exemple 18 : Préparation d'un composé conjugué de chlorure de (3-nitro 4-fluorophényl)triméthyl pyridylum porphyrine d'indium et d'un anticorps.

35 L'anticorps utilisé est un anticorps monoclonal anti ACE (anti-antigène carcinoembryonnaire). Cet anticorps est dirigé contre les antigènes

exprimés par les tumeurs colorectales.

On introduit, dans 1ml d'une solution de bicarbonate de sodium 0,5M, $2,6 \cdot 10^{-2}$ μ mol de l'anticorps et $2,6 \cdot 10^{-1}$ μ mol de la porphyrine d'indium obtenue dans l'exemple 9. Après 12h de contact, on chromatographie le composé conjugué anticorps-porphyrine sur colonne de gel Sephadex G100 préalablement saturé en sérum albumine humaine (HSA). On récupère le composé conjugué par fractions de 1ml entre la 4^e et la 7^e fractions.

On vérifie le couplage par centrifugation sur une membrane qui laisse passer les molécules ayant une masse molaire inférieure à 50000. Le rendement de couplage est de 60%.

L'immunoréactivité du complexe est égale à 45% et le nombre de porphyrines par anticorps est de 10.

Exemple 19 : Préparation d'un composé conjugué de la porphyrine métallée obtenue dans l'exemple 10 et d'un anticorps monoclonal anti ACE.

On suit le même mode opératoire que dans l'exemple 18 et on obtient le composé conjugué correspondant ayant 10 porphyrines par anticorps. Le rendement de couplage est de 75%.

Exemple 20 : Préparation du composé conjugué du chlorure de l'ester 4-méthylmercaptophénylique de la (4-(carboxyméthoxy)phényl)triméthylpyridylum porphyrine de l'indium et de l'anticorps anti ACE.

On ajoute $12,5 \cdot 10^{-2}$ μ mol de la porphyrine obtenue dans l'exemple 13 à $2,6 \cdot 10^{-2}$ μ mol de l'anticorps ACE, puis on complète le volume à 1ml par addition d'eau (pH de 6 à 7). Après un temps de contact de 2h, on purifie le composé conjugué porphyrine-anticorps par chromatographie sur phase anionique. Le rendement de couplage est de 35%.

La stabilité des composés conjugués obtenus dans les exemples 18 à 20 est très bonne. En effet, après 48h à la température ambiante, la mesure de l'activité restante après une nouvelle centrifugation sur une membrane "centricon" montre que les composés conjugués sont intégralement conservés.

10

15

20

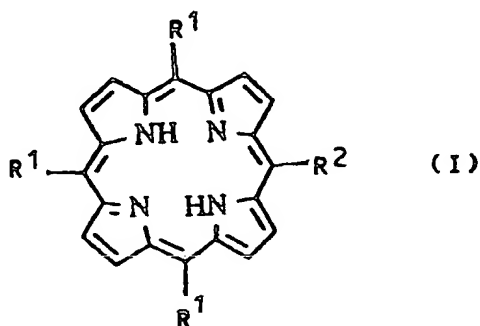
25

30

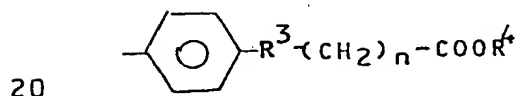
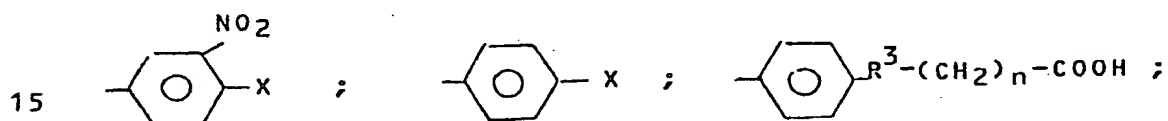
35

REVENDICATIONS

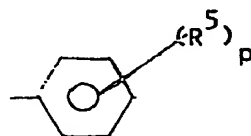
1. Dérivé de porphyrine répondant à la formule :



10 dans laquelle les R^1 représentent un radical pyridyle, et R^2 représente un radical choisi parmi les radicaux répondant aux formules :



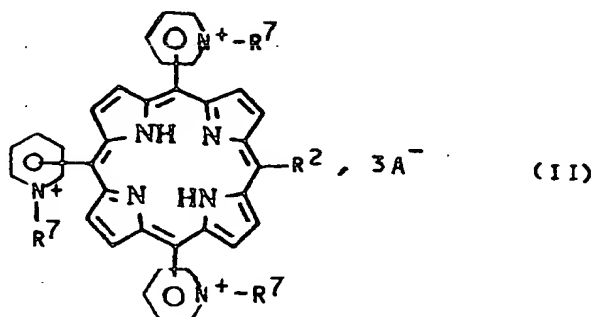
25 dans lesquelles X représente F, Cl ou Br, R^3 est une simple liaison, S ou O, n est un nombre entier de 1 à 7 et R^4 est un radical alkyle en C_1 à C_4 , un radical benzyle ou le radical de formule :



30 dans laquelle R^5 est choisi parmi F, Cl, Br, I, NO_2 et le radical de formule SR^6 dans laquelle

R^6 est un radical alkyle en C_1 à C_4 , p est égal à 1 lorsque R^5 représente NO_2 ou SR^6 , p est égal à 4 ou 5 lorsque R^5 représente F , Cl , Br ou I , et R^5 est en position ortho ou para lorsque p est égal à 1; et les sels de pyridylum de ce dérivé de formule (I).

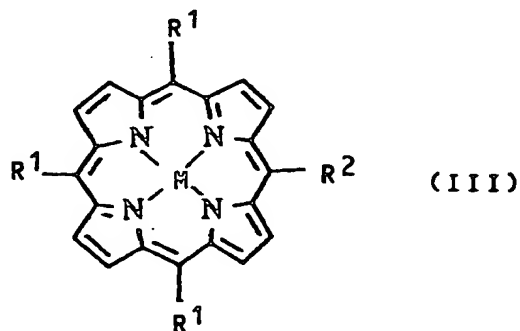
2. Dérivé de porphyrine selon la revendication 1, sous la forme de sel de pyridylum, caractérisé en ce qu'il répond à la formule :



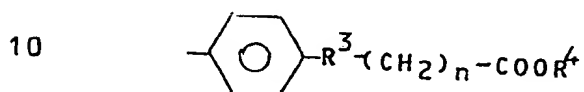
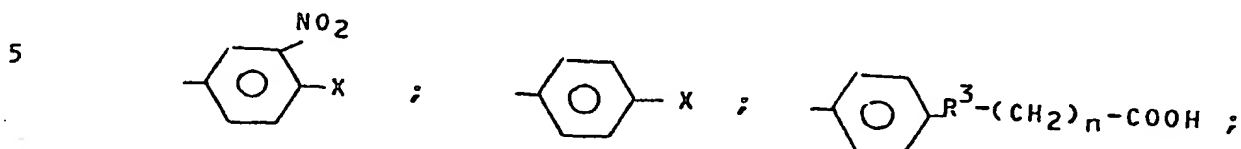
dans laquelle R^2 a la signification donnée dans la revendication 1, R^7 est un radical alkyle en C_1 à C_4 , et A est un anion choisi parmi Cl^- , Br^- et I^- .

3. Dérivé selon la revendication 2, caractérisé en ce que R^7 est le radical méthyle ou éthyle et A représente Cl^- .

4. Dérivé de porphyrine répondant à la formule :



dans laquelle les R^1 représentent un radical pyridyle, et R^2 représente un radical choisi parmi les radicaux répondant aux formules :

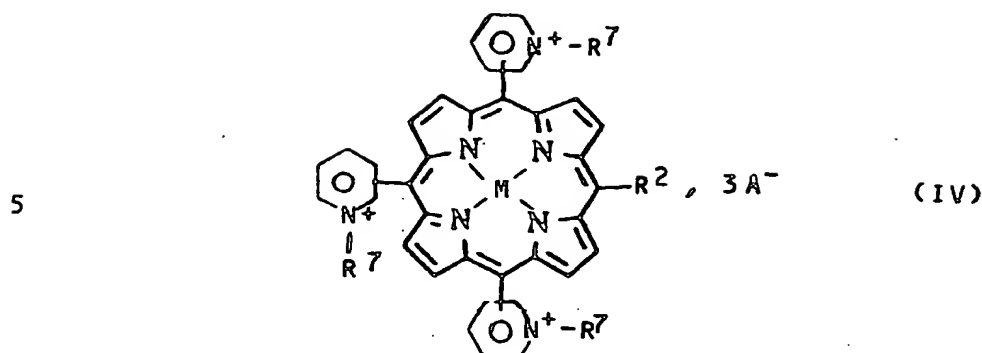


dans lesquelles X représente F, Cl ou Br, R^3 est une simple liaison, S ou O, n est un nombre entier de 1 à 7 et R^4 est un radical alkyle en C_1 à C_4 , un radical benzyle ou le radical de formule :



dans laquelle R^5 est choisi parmi F, Cl, Br, I, NO_2 et le radical de formule SR^6 dans laquelle R^6 est un radical alkyle en C_1 à C_4 , p est égal à 1 lorsque R^5 représente NO_2 ou SR^6 , p est égal à 4 ou 5 lorsque R^5 représente F, Cl, Br ou I, R^5 est en position ortho ou para lorsque p est égal à 1, et M est un métal ; et les sels de pyridylum de ce dérivé de formule (III).

30 5. Dérivé de porphyrine selon la revendication 4 sous la forme de sel de pyridylum répondant à la formule :



10 dans laquelle R^2 a la signification donnée dans la revendication 4, R^7 est un radical alkyle en C_1 à C_4 , A est un anion choisi parmi Cl^- , Br^- et I^- , et M est un métal.

15 6. Dérivé selon la revendication 5, caractérisé en ce que R^4 est le radical méthyle ou éthyle, et A représente Cl^- .

20 7. Dérivé selon l'une quelconque des revendications 4 à 6, caractérisé en ce que M est un métal radioactif choisi parmi l'indium, le gadolinium, l'yttrium, le rhénium, le technétium, l'étain, le gallium, le cuivre, le zinc et le nickel.

8. Dérivé selon la revendication 7, caractérisé en ce que M est l'indium-111, le technétium-99m, le rhénium-186 ou le rhénium-188.

25 9. Dérivé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que R^2 représente :



35 10. Dérivé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que R^2 représente :

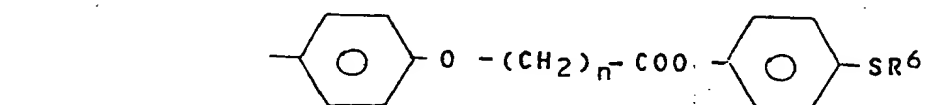


5 11. Dérivé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que R^2 représente le radical de formule :



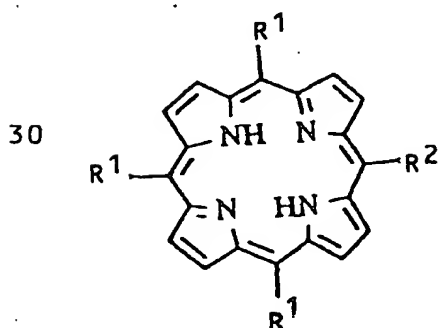
dans laquelle n est un nombre entier de 1 à 7.

15 12. Dérivé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que R^2 représente le radical de formule :

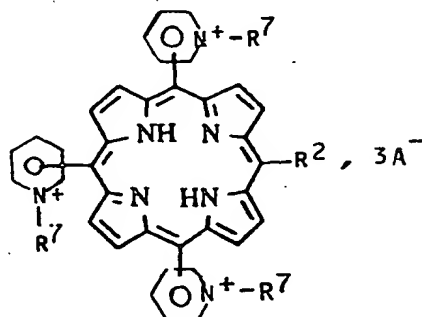


dans laquelle n est un nombre entier de 1 à 7 et R^6 est le radical méthyle ou éthyle.

25 13. Composé conjugué d'une molécule biologiquement active et d'un dérivé de porphyrine répondant aux formules :

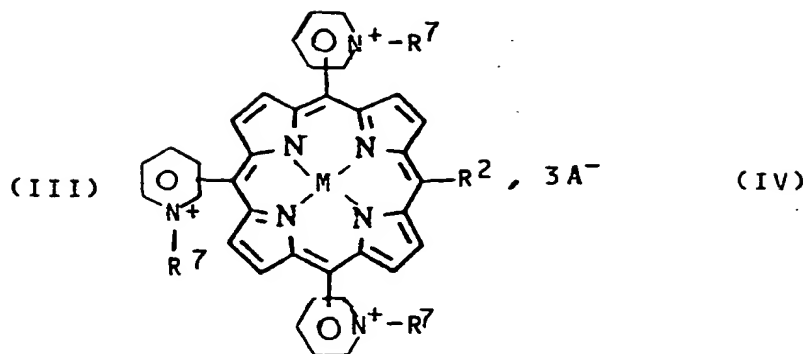
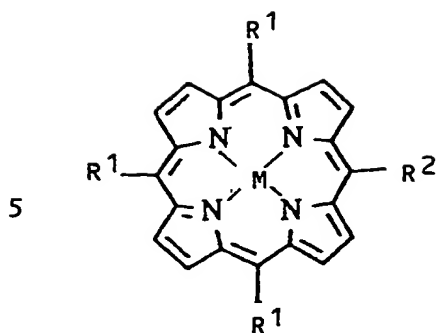


(I)

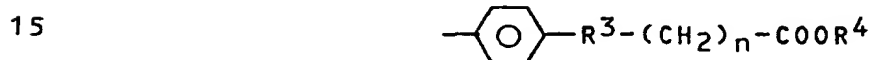


(II)

32



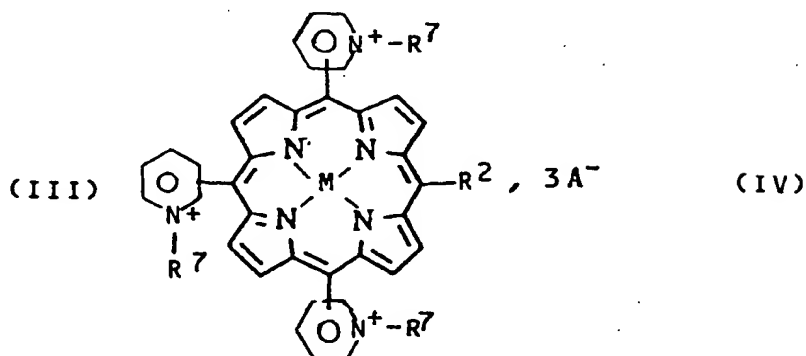
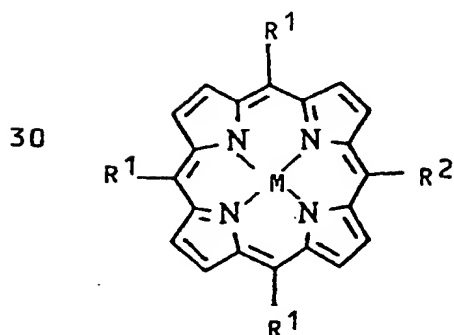
10 dans lesquelles R^1 , R^2 , R^7 , A et M ont les significations données dans les revendications 1, 2, 4, et 5 à condition que R^2 ne représente pas le radical de formule :



avec R^4 représentant un radical alkyle ou benzyle.

14. Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend un dérivé de porphyrine ou un composé conjugué selon l'une quelconque des revendications 1 à 13.

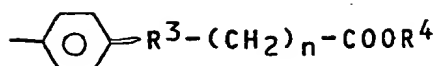
15. Produit radiopharmaceutique pour la thérapie ou le diagnostic, caractérisé en ce qu'il comprend un composé conjugué d'une molécule biologiquement active et d'un dérivé de porphyrine répondant aux formules :



35

dans lesquelles R^1 , R^2 , R^7 et A ont les significations données dans les revendications 4 et 5 à

condition que R^2 ne représente pas le radical de formule :



5

avec R^4 représentant un radical alkyle ou benzyle, et M est un métal radioactif choisi parmi l'indium, le gadolinium, l'yttrium, le rhénium, le technétium, l'étain, le gallium, le cuivre, le zinc et le nickel.

10

16. Produit radiopharmaceutique selon la revendication 15, caractérisé en ce que M est l'indium-111, le technétium-99m, ou le rhénium-186 ou le rhénium-188.

15

17. Produit radiopharmaceutique selon l'une quelconque des revendications 15 et 16, caractérisé en ce que la molécule biologiquement active est un anticorps.

20

25

30

35

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLERAPPORT DE RECHERCHE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la rechercheFR 9000214
FA 438246

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
A	EP-A-0 345 171 (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE) * revendications 1-5,9; exemples 1-4 *	1-7,14
A,D	JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS vol. 105, 1987, pages 153-164; J.C. ROBERTS et al.: "Preparation and characterization of copper-67 porphyrin-antibody conjugates"	1,4,13, 15,17
A,D	US-A-4 783 529 (D.K. LAVALLEE et al.) * le document en entier *	1,4,13, 15,17
A	BULLETIN OF THE CHEMICAL SOCIETY OF JAPAN vol. 54, 1981, pages 3879,3880; S. TAKAGI et al.: "Synthesis of Amphiphilic Porphyrins"	1-7
A	EP-A-0 127 797 (F. HOFFMANN-LA ROCHE UND CO. AG) * revendications 1,8,9 *	1,2
A	EP-A-0 186 962 (EFAMOL LTD.) * abrégé; page 5 *	1
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 7, no. 277 (C-199)(1422), 9 décembre 1983; & JP-A-58154581 (MITSUBISHI KASEI KOGYO K.K.) 14.09.1983	1
Date d'achèvement de la recherche		Examinateur
17-10-1990		HASS C V F
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>		